Prepared in December 2006 (First version)

Reagent for food inspection

NH IMMUNOCHROMATO SALMONELLA <<Instruction Manual>>

* Please read this manual carefully before using the kit.

Product number : 999300000

[Development history]

Salmonella food poisoning is one of the most important food poisoning in the world. In recent years, *Salmonella* has been one of the leading causes of food poisoning in Japan: a total of 144 food poisonings affected 3,700 people, resulting in one death in 2005.

Salmonella has more than 2,500 serotypes[1)], about 1,500 of which are pathogenic to humans and animals. Among them, *S.Enteritidis* has been rapidly emerging as a cause of food poisoning through chicken eggs and their products: food poisoning by *S.Enteritidis* accounts for 50% to 62% of all *salmonella* food poisonings[2)].

This kit is designed to detect *S.Enteritidis*, the most problematic bacterium among *salmonella* in food and provide a test result in a short time with only a simple method due to its immuno-chromatographic principle.

[Characteristics]

1) This product does not need skill because it can be handled only with a one-step procedure.
2) It rapidly provides a test result.
3) It needs no specific detector.

[Contents of kit]

1) Components

A: Test plate: 5 tests × 4
B: Instruction manual

2) Components and volume (per test)

(1)	Anti-*Salmonella* polyclonal antibody (rabbit)	0.25 µg
(2)	Gold colloid labeled anti-*Salmonella* polyclonal antibody (rabbit)	0.075 µg
(3)	Anti-rabbit immunoglobulin polyclonal antibody (goat)	0.25 µg

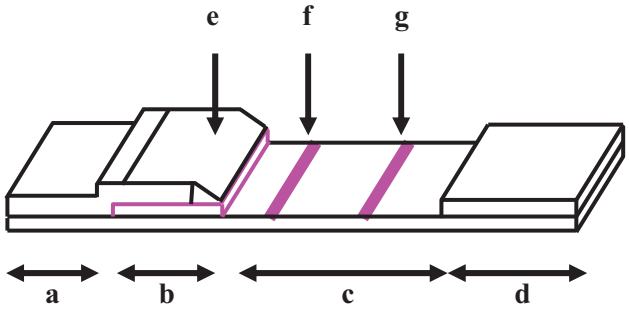
[Objective]

1) Detection of *Salmonella* (*S.Enteritidis*) in food products

Note) This kit is intended to specifically detect *S.Enteritidis* and therefore cannot detect other serotypes of *Salmonella*.

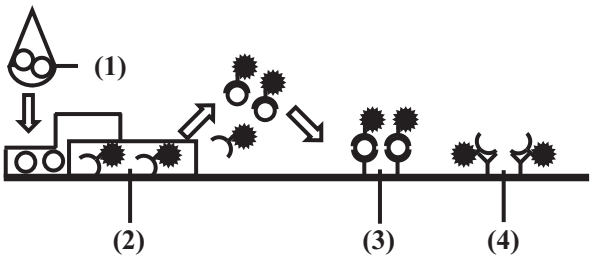
[Test plate part name and detection principle]

1) Part names



a. Sample dropping part (Take care not to touch it with your hands)
b. Reagent containing part
c. Spread area (Take care not to touch it with your hands or damage it)
d. Absorption pad
e. Measurement item entering area
f. Test line appearance position (about 30 mm from the sample dropping part)
g. Control line appearance position (about 38 mm from the sample dropping part)

2) Detection mechanism



When a sample solution is dropped at the sample dropping part of the test plate, the gold colloid labeled anti-Salmonella antibody (2) is dissolved to form complexes with Salmonella (1) in the sample solution. The complexes migrate across the spread area by capillarity and are then trapped by the anti-Salmonella antibody (3) fixed at the test line appearance position to develop a reddish purple line by the gold colloid. Thus, whether the sample solution contains Salmonella or not can be determined by visually inspecting the test line appearance position.

Irrespective of the presence/absence of Salmonella in the sample solution, the excess gold colloid labeled antibody further migrates across the spread area and is then trapped by the anti-rabbit immunoglobulin goat antibody (4) fixed at the control line appearance position to develop a reddish purple line. It can be confirmed that the sample solution has migrated across the spread area by the development of the line.

[Preparation of sample solution]

*: The preparation of the sample solution is based on the Guidelines on Food Hygiene Testing[3)].

1) Necessary apparatus and equipment

Stomacher bag (that with a filter is recommended), stomacher, incubator (35.0 ± 1.0°C and 43.0 ± 1.0°C), autoclave, enrichment medium, etc.

2) Sample preparation

(1) When the food is solid, collect small samples from as many sites as possible to make up a solid sample of 25 g. When the food is liquid, stir it well before collecting a sample of 25 mL.

3) Enrichment culture

(1) Add the sample to the pre-enrichment medium (buffered peptone water, EEM bouillon, and lactose bouillon) at a volume that is nine times as much as the sample. Treat it with a stomacher for an appropriate time depending on the sample and culture it at 35.0 ± 1.0°C for 18 ± 2 hours.

(2) Add 1 ml of the pre-enrichment culture solution to 15 ml of the selected enrichment medium (Rappaport-Vassiliadis [RV] culture medium, selenite brilliant green [SBG] culture medium, and Hajna tetrathionate [TT] culture medium) and culture it at 43.0 ± 1.0°C for 18 hours.

Note 1: When a liquid egg is used as a sample, use a buffered peptone water containing L-cysteine (0.2 g/L) or $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (64 mg/L) as a pre-enrichment medium and culture it at 36.0 ± 1.0°C for 22 ± 2 hours.

Note 2: When a liquid egg is used as a sample, inoculate 0.5 mL of the pre-enrichment culture solution to 10 mL each of the RV and TT culture media and culture them at 42.0 ± 0.5°C for 22 ± 2 hours.

Note 3: Keep the remaining culture solution safely without sterilizing it until the end of the test because it may be used for confirming the test result of the kit.

Note 4: Use the culture solution without sterilization with full attention to prevent infection because sterilizing the culture solution may reduce detection sensitivity.

[Test procedure]

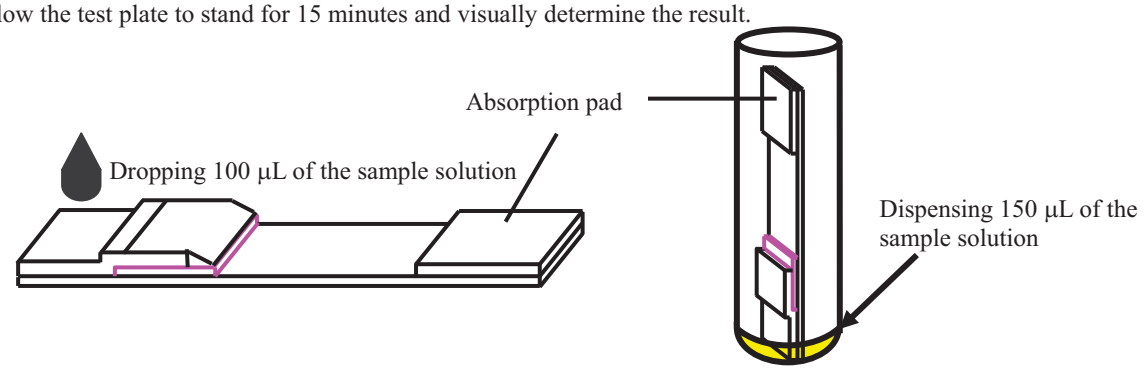
1) Test procedure of NH IMMUNOCHROMATO Salmonella

(1) Allow test plates to room temperature without removing them from the aluminum pouch and remove a necessary number of the test plates from the pouch immediately before use.

(2) Write the sample name or specimen number on the absorption pad of each test plate using a felt pen.

(3) Place the test plate on a horizontal plane and drop 100 µL of the sample solution onto the sample dropping part (see the following left figure). Alternatively, dispense 150 µL of the sample solution into a test tube and place the test plate into the test tube so that the sample dropping part will be immersed in the sample solution (see the following right figure).

(4) Allow the test plate to stand for 15 minutes and visually determine the result.



Note 1: Since moisture may adversely affect the performance of the test plate, remove it from the aluminum pouch after it is allowed to room temperature.

Note 2: Return any unused test plate into the plastic pouch with a desiccating agent and put the pouch into the aluminum pouch. Keep the aluminum pouch in a refrigerator.

Note 3: Take care not to touch or damage the sample dropping part and spread area of the test plate. Hold the test plate by the absorption pad.

Note 4: Use only a sterilized pipette or tip to drop or dispense the sample solution. Do not use one pipette or tip for more than one sample solution.

Note 5: Take care not to make the sample solution overflow from the test plate when dropping 100 µL of the sample solution. Take appropriate measures for preventing the overflow, such as dividing the solution into two portions and dropping them separately, as required.

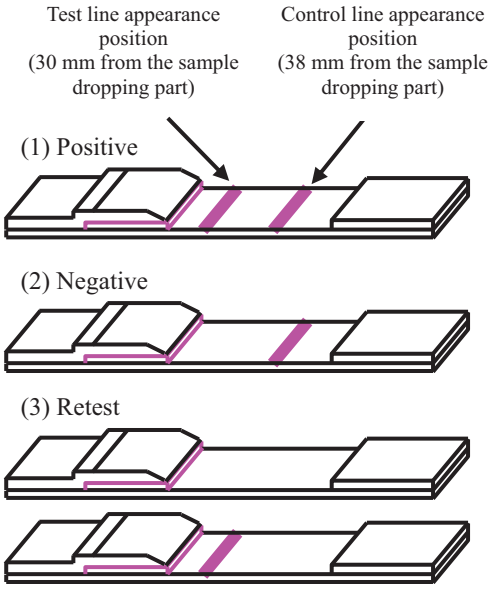
Note 6: To prevent infection, spread a plastic wrap or equivalent and place a test plate on it when you choose to perform the test by dropping the sample solution onto the test plate.

3) Determination of result

(1) Determine the sample as positive when a reddish purple line is observed at both the test line appearance and control line appearance positions 15 minutes after the test is started. When no or only a light reddish purple line is observed at the test line appearance position at that time, check the position again 60 minutes after the test is started.

(2) Determine the sample as negative when a reddish purple line is not observed at the test line appearance position, but is observed only at the control line appearance position.

(3) When no reddish purple line is observed at the control line appearance position, repeat the test, irrespective of the presence/absence of a reddish purple line at the test line appearance position because the spread of the sample solution may have been abnormal.



Note 1: For the sample determined as positive by this kit, confirm the result with other test methods, such as the official inspection method. The sample cultured in the enrichment medium for this kit can be used for confirmation tests, such as the official inspection method.

[Performance]

1) Sensitivity test

When a sample containing *S.Enteritidis* ATCC 13076 is tested according to the "Preparation of sample solution" and "Test procedure" of the present instruction manual, a positive test result is obtained when the bacterial concentration of the sample is 1×10^6 CFU/mL or higher.

2) Reproducibility test

When *S.Enteritidis*-positive and -negative sample solutions are simultaneously tested three times each, the positive solution is determined as positive and the negative solution as negative for all the repetitions.

3) Minimum detection sensitivity

It was confirmed from a test using two standard and three isolated strains of *S.Enteritidis* that the minimum detection sensitivity of the kit ranged from 1×10^5 to 1×10^7 CFU/mL.

Note 1: The minimum detection sensitivity of the kit may vary depending on the strains of *S.Enteritidis*, type of the enrichment culture medium, and sample components.

4) Cross-reactivity

(1) No cross-reactivity has been detected with the following strains.

	Control number	Result
Escherichia coli	ATCC 1175	-
Citrobacter freundii	ATCC 8090, 43864	-
Enterobacter aerogenes	ATCC 13048	-
Enterobacter cloacae	ATCC 13047, 49141	-
Enterobacter sakazakii	ATCC 51329	-
Klebsiella oxytoca	ATCC 8724	-
Klebsiella pneumoniae	ATCC 4352	-
Serratia liquefaciens	ATCC 27592	-
Serratia marcescens	ATCC 8100	-
Serratia odorifera	ATCC 33077	-

(2) Among serotypes other than *S.Enteritidis*, this kit has been confirmed to respond to *S. abaetetuba* and *S. anatum*.

[Precautions for use and handling]

1) Precautions for use

(1) Read the instruction manual carefully before using this kit. Follow the instructions of the manual.
(2) Do not use the kit after its expiration date indicated in the aluminum pouch label.
(3) This kit is intended for detecting *S.Enteritidis* in food and not intended for making a clinical diagnosis.
(4) This kit may show a false-positive result due to the effect of sample components. For the sample determined as positive by this kit, confirm the result with other test methods, such as the official inspection method.
(5) For the equipment and reagents (including culture media) used for preparing a sample solution, follow the instructions provided by their manufacturers or distributors.
(6) This instruction manual is intended to be a guideline for inspectors. Verify the appropriateness of the procedure of the manual and the applicability of this kit to each food.
(7) The specifications of the kit are subject to change without prior notice.

2) Precautions for preventing risk

(1) Take appropriate safety measures in performing the test, such as putting on protective gloves and glasses, because *Salmonella*, the target bacteria of this kit, may cause infection even at a trace level and because other microbes can cause infection.
(2) Use this kit with appropriate equipment and facilities under the supervision of an eligible manager according to an appropriate standard microbiological test procedure.
(3) When the sample solution accidentally enters the eye or mouth, take immediate emergency measures, such as rinsing it with tap water, and receive medical attention.
(4) Immediately receive medical attention if you feel any physical abnormality after using this kit.

3) Precautions for disposal

(1) Since the test plates, enrichment media, and any remaining sample or sample solution used for the test may be infectious, sterilize them with an appropriate method, such as autoclaving them at 121°C for 20 minutes or immersing them in a 0.1% sodium hypochlorite solution for at least one hour.
(2) Dispose of this kit and any remaining sample or sample solution according to local regulations on waste disposal with full attention to the possible effect on sanitation and environment.

[Storage and expiration date]

1) Storage: Keep this kit refrigerated (2 to 8°C) in a dark place. Take care not to freeze it.
2) Expiration date: 12 months after the date of manufacture

[Package unit]

NH IMMUNOCHROMATO Salmonella for 20 tests

[References]

1) Popff, M.Y.: Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th ed, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur (2001).
2) National Institute of Infectious Diseases: Pathogenic microbe detection information, Vol. 27, No. 8, 2006.
3) Japanese Ministry of Health, Labour, and Welfare: Guidelines on Food Hygiene Testing, Volume of Microorganisms, Japan Food Hygiene Association, 180-191 (2004).

Manufacturered by Nippon Meat Packers, Inc. R&D Center

Distributor
COSMO BIO CO., LTD.
Inspiration for Life Science
TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN
http://www.cosmobio.co.jp e-mail : export@cosmobio.co.jp
Phone : +81-3-5632-9617 FAX : +81-3-5632-9618

【使用上または取り扱い上の注意事項】

1） 使用上の注意事項

① 本キットをご使用になる際には、取扱説明書をよく読み、記載された試験方法に従って使用してください。
② 使用期限の過ぎたキットは使用しないでください。使用期限はアルミパウチ袋ラベルに記載されています。
③ 本キットは食品中から *S.* Enteritidis を検出するための試薬であり、臨床的診断を下す目的で使用することはできません。
④ 試料中の成分の影響により、偽陽性が示される可能性があります。本キットで陽性を示した試料については、公定検査法等他の方法により、必ず確認を行ってください。
⑤ 試料溶液の調製に使用する器具ならびに試薬類（培地を含む）の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
⑥ 本取扱説明書は検査担当者のガイドラインとして作成されています。各操作手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
⑦ 商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

2） 危険防止上の注意事項

① 本キットの検出対象であるサルモネラは微量でも感染する可能性があります。また、サルモネラ以外の微生物による感染の可能性もあるため、試験を実施する際には保護手袋、保護メガネ等を着用するなど十分留意してください。
② 試験を実施する際には、適切な設備・施設で行い、責任ある管理者の指導のもとで標準的な微生物検査手順にて実施してください。
③ 誤って試料溶液等が目や口に入った場合には、直ちに水道水で洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。
④ 本キットによる試験実施後、身体に異常を感じた場合には、直ちに医師の手当てを受けてください。

3） 廃棄上の注意事項

① 試験に使用したテストプレートや増菌培地、試料および試料溶液の残り等は、感染の可能性があると考え、必ずオートクレーブ処理（121℃、20 分）、もしくは 0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸すなどの適切な滅菌処理を施してください。
② 本キットならびに試料および試料溶液の残りなどを廃棄する場合には、当該地域の廃棄物に関する規定に従い、衛生面、環境面に十分配慮し廃棄してください。

【貯法・使用期限】

1） 貯法 ： 冷蔵（2～8℃）、遮光にて保存してください。また、凍結は避けてください。
2） 使用期限 ： 製造日より 12 ヶ月。

【包装単位】

NH イムノクロマト サルモネラ　　20 テスト入

【参考文献】

1） Popff,M.Y. : Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th ed, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur (2001).
2） 国立感染症研究所：病原微生物検出情報, Vol. 27, No.8, 2006.
3） 厚生労働省監修：食品衛生検査指針微生物編,（社）日本食品衛生協会, 180-191 (2004).

〔販売元および問い合わせ先〕

アルミパウチ袋に記載

〔製造元〕

〒300-2646　茨城県つくば市緑ヶ原 3-3
日本ハム株式会社　中央研究所
電話：029(847)7825／FAX：029(847)7824
URL：http://www.rdc.nipponham.co.jp

2006 年 12 月作成（第 1 版）

[食品検査用試薬]

NH イムノクロマト サルモネラ ≪取扱説明書≫

※本キットをご使用になる前に必ずお読みください。

【開発の経緯】

サルモネラによる食中毒は、世界的に最も重要な食中毒のひとつとなっています。日本国内でもここ数年常に食中毒事例数で一、二を争っており、2005 年度は、144 件の食中毒事例で 3700 人の患者が発生し、一人が死亡しています。

サルモネラには 2500 種類以上の血清型があり[1]、その中でヒトや動物に病原性がある血清型は、1500 種程度となっています。これらのうち、食中毒事例では *S.* Enteritidis が鶏卵食品を原因として急増しており、サルモネラ食中毒事例のうち 50-62%を占めています[2]。

本品は、サルモネラの中でも問題となる可能性の高い *S.* Enteritidis を食品中より検出するためのキットで、イムノクロマト法を原理とするため、簡単な操作で短時間に結果を得ることができます。

【本品の特徴】

1） 1 ステップの簡単な操作のため、習熟を必要としません。
2） 迅速に結果が得られます。
3） 特別な検出装置を必要としません。

【キットの内容】

1） 構成品

A： テストプレート…… 5 テスト×4
B： 取扱説明書…… 1 部

2） 成分・容量（1 テストあたり）

① 抗サルモネラポリクローナル抗体（ウサギ） …… 0.25μg
② 金コロイド標識抗サルモネラポリクローナル抗体（ウサギ） …… 0.075μg
③ 抗ウサギ免疫グロブリンポリクローナル抗体（ヤギ） …… 0.25μg

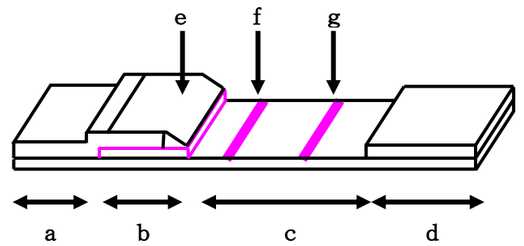
【目的】

1） 食品中に含まれるサルモネラ（*S.* Enteritidis）の検出。

注）本キットは *S.* Enteritidis を特異的に検出するキットのため、他の血清型の Salmonella を検出することはできません。

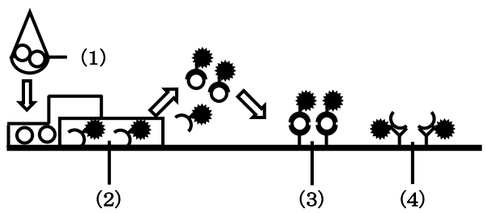
【テストプレート各部名称および検出原理】

1） テストプレート各部名称



a. 試料滴下部（手で触れないよう注意してください。）
b. 試薬含有部
c. 展開部
（手で触れたり、キズをつけないよう注意してください。）
d. 吸収パッド
e. 測定項目記載位置
f. テストライン出現位置（試料滴下部より約 30mm）
g. コントロールライン出現位置（試料滴下部より約 38mm）

2） 検出原理



テストプレートの試料滴下部に試料溶液を滴下すると、試薬含有部に含まれる金コロイド標識抗サルモネラ抗体（2）が溶解し、試料溶液中のサルモネラ（1）と複合体を形成します。これらの複合体は展開部を毛細管現象により移動し、テストライン出現位置に固定化された抗サルモネラ抗体（3）に捕捉され、金コロイドによる赤紫色のラインが出現します。本キットはこの赤紫色のラインを目視により確認し、試料溶液中のサルモネラの有無を判定します。
一方、試料溶液中のサルモネラの有無に関わらず、余剰の金コロイド標識抗体が展開部をさらに移動し、コントロールライン出現位置に固定化された抗ウサギ免疫グロブリンヤギ抗体（4）に捕捉され、赤紫色のラインを形成します。このラインの有無により、試料溶液が展開部を正常に移動したことを確認します。

【試料溶液の調製】

※　試料溶液の調製方法は、食品衛生検査指針[3)]に元に記載しています。

1）　必要な機器・器材

ストマッカー袋（フィルター付を推奨）、ストマッカー、インキュベーター（35.0±1.0℃、43.0±1.0℃）、オートクレーブ、増菌用培地、ほか

2）　試料の調製

①　固体の場合には、できるだけ多くの部位から少しずつ採取した 25g、液体の場合にはよく混合した 25mL を試料としてください。

3）　増菌培養

①　試料に対し 9 倍量の前増菌用培地（緩衝ペプトン水、EEM ブイヨン、乳糖ブイヨン）を加え、試料によって適切な時間ストマッキングし、35.0±1.0℃，18±2 時間培養してください。

②　前増菌培養液1mL を選択増菌培地（ラパポート・バシリアディス（RV）培地、セレナイトブリリアントグリーン（SBG）培地、ハーナ・テトラチオン酸塩（TT）培地）15mL に加え、43.0±1.0℃、18 時間培養してください。

注1　液卵を検体とする場合には、前増菌用培地は L-システイン（0.2g/L）または $FeSO_4 \cdot 7H_2O$（64mg/L）を添加した緩衝ペプトン水を用いて、36.0±1.0℃，22±2 時間培養してください。

注2　液卵を検体とする場合には、前増菌培養液 0.5mL を RV 培地 10mL および TT 培地 10mL それぞれに接種し、42.0±0.5℃，22±2 時間培養してください。

注3　培養液の残りは、本キット試験実施後の確認試験に使用する可能性があるため、試験終了後まで滅菌せず安全に注意して保存してください。

注4　滅菌後の培養液を用いて試験を行った場合、検出感度が低下する可能性があるため、感染防止に十分配慮した上で、培養液は滅菌せずにご使用ください。

【試験操作】

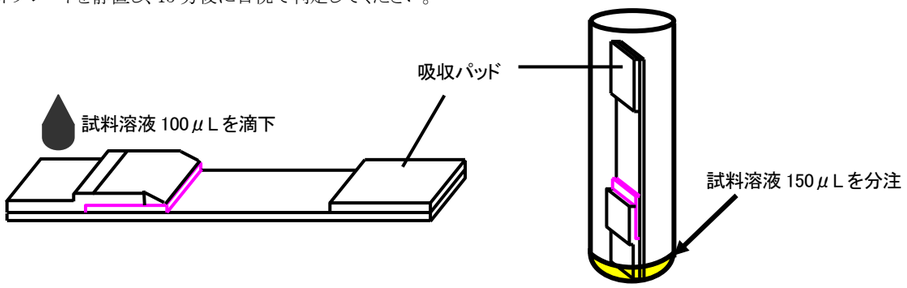
1）　NH イムノクロマトサルモネラ試験操作

①　テストプレートをアルミパウチ袋に入れたまま室温に戻し、使用直前に必要量アルミパウチ袋から取り出してください。

②　取り出したテストプレートの吸収パッドに油性ペン等を用いて、試料名もしくは検体番号等を記入してください。

③　テストプレートを水平な台の上に静置し、試料滴下部に試料溶液 100μL 滴下してください（下記左図）。もしくは、試料溶液 150μL を試験管に分注し、テストプレートの試料滴下部が試料溶液に浸かるようにテストプレートを試験管に添加してください（下記右図）。

④　テストプレートを静置し、15 分後に目視で判定してください。



注 1：　テストプレートは吸湿の影響により、正しい結果が得られないことがあるため、室温に戻してからアルミパウチ袋から取り出してください。

注 2：　使用しないテストプレートは乾燥剤とともにビニールパウチ袋に戻し、さらにアルミパウチ袋に入れて冷蔵保存してください。

注 3：　テストプレートの試料滴下部および展開部には、直接手などで触れたり、キズをつけないよう注意してください。テストプレートを持つ場合には、吸収パッドを持つようにしてください。

注 4：　試料溶液を滴下もしくは分注するために使用するピペットもしくはチップは必ず滅菌済みのものを使用し、試料溶液ごとに交換してください。

注 5：　試料溶液 100μL を滴下する際には、テストプレートから溢れないよう注意し、必要に応じ、2 回に分けて滴下するなどしてください。

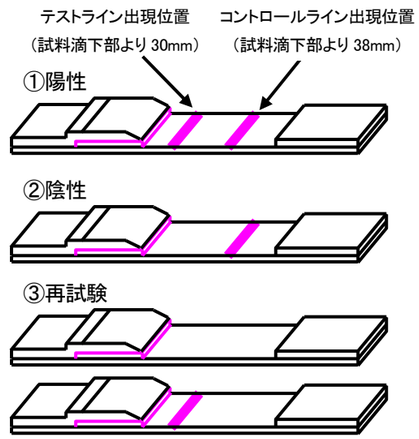
注 6：　作業者の感染防止のため、試料溶液を滴下して試験を行う際には、テストプレートの下にラップなどを敷いて試験を行うことをお勧めします。

3）　結果の判定

①　試験開始 15 分後にテストライン出現位置およびコントロールライン出現位置に赤紫色のラインが観察される場合には、陽性と判定してください。また、試験開始 15 分後にテストライン出現位置に赤紫色のラインが認められない場合、もしくはラインが薄い場合には、試験開始 60 分後に再度確認してください。

②　テストライン出現位置に赤紫色のラインが認められず、コントロールライン出現位置にのみ赤紫色のラインが観察される場合には、陰性と判定してください。

③　コントロールライン出現位置に赤紫色のラインが認められない場合には、テストライン出現位置における赤紫色のラインの有無に関わらず、再試験としてください。試料溶液の展開に異常があった可能性があります。



注1：　本キットで陽性と判定された試料については、公定検査法などその他の方法にて必ず確認試験を実施してください。なお、本キットの試験に用いた増菌培養済み試料を公定検査法などの確認試験に使用することが可能です。

【性能】

1）　感度試験

S. Enteritidis ATCC13076 を用いて、本取扱説明書に記載された「試料溶液の調製」および「試験操作」に従い試験を行うとき、1×10^6CFU/mL 濃度以上のとき、陽性を示します。

2）　再現性試験

S. Enteritidis 陽性の試料溶液、および陰性の試料溶液を各 3 回同時に試験するとき、陽性の試料溶液はすべて陽性、陰性の試料溶液はすべて陰性を示します。

3）　最小検出感度

S. Enteritidis 標準株 2 株、分離株3株による試験の結果、1×10^5～1×10^7CFU/mL が最小検出感度であることが確認されています。

注 1：　本キットの最小検出感度は、*S.* Enteritidis の菌株、増菌培地の種類、および試料中の成分の影響により変動する場合があります。

4）　交差反応性

①　以下の菌株との交差反応性は認められませんでした。

	管理番号	試験結果
Escherichia coli	ATCC 1175	－
Citrobacter freundii	ATCC 8090, 43864	－
Enterobacter aerogenes	ATCC 13048	－
Enterobacter cloacae	ATCC 13047, 49141	－
Enterobacter sakazakii	ATCC 51329	－
Klebsiella oxytoca	ATCC 8724	－
Klebsiella pneumoniae	ATCC 4352	－
Serratia liquefaciens	ATCC 27592	－
Serratia marcescens	ATCC 8100	－
Serratia odorifera	ATCC 33077	－

②　*S.* Enteritidis 以外の血清型のうち *S.*abaetetuba、*S.*anatum に対して反応することが確認されています。